



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 30 328 T2** 2006.12.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 413 582 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 30 328.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 028 817.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **27.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07D 519/00** (2006.01)

**A61K 31/5517** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**C07D 487/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**9818733**      **27.08.1998**      **HN**

**9901929**      **28.01.1999**      **GB**

(73) Patentinhaber:

**Spirogen Ltd., Ryde, Isle of Wight, GB**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Thurston, Edwin, David, 29/39 Brunswick Square  
London WC1N 1AX, GB; Howard, Wilson, Philip,  
29/39 Brunswick Square London WC1N 1AX, GB**

(54) Bezeichnung: **Dimere Pyrrolobenzodiazepine**

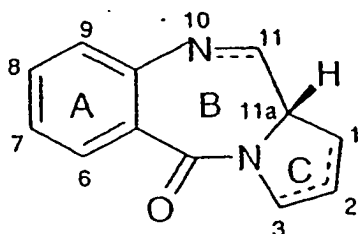
Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

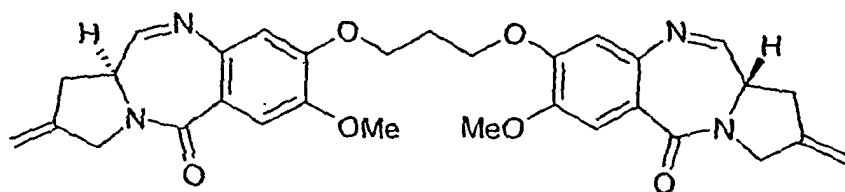
## Hintergrund der Erfindung

**[0001]** Manche Pyrrolobenzodiazepine (PBDs) verfügen über die Fähigkeit, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und sich an diese zu binden, wobei PuGpu die bevorzugte Sequenz darstellt. Anthramycin, das erste PBD-Antitumorantibiotikum, wurde 1965 entdeckt (Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc. 87, 5793–5796 (1965); Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc. 87, 5791–5793 (1965)). Seither ist von einer Reihe von natürlich vorkommenden PBDs berichtet worden, und über 10 Synthesewege für verschiedene Analoga wurden entwickelt (Thurston et al., Chem. Rev. 433–465 (1994)). Familienmitglieder umfassen Abbeymycin (Hochlowski et al., J. Antibiotics 40, 145–148 (1987)), Chicamycin (Konishi et al., J. Antibiotics 34, 200–206 (1984)), DC-81 (japanisches Patent 58–180 487; Thruston et al., Chem. Brit. 26, 767–772 (1990)); Bose et al., Tetrahedron 48, 751–758 (1992)), Mazethramycin (Kuminoto et al., J. Antibiotics 33, 665–667 (1980)), Neothramycine A und B (Takeuchi et al., J. Antibiotics 29, 93–96 (1976)), Porothramycin (Tsunakawa et al., J. Antibiotics 41, 1366–1373 (1988)), Prothracarcin (Shimizu et al., J. Antibiotics 29, 2492–2503 (1982)); Langley und Thurston, J. Org. Chem. 52, 91–97 (1987)), Sibanomicin (DC-102) (Hara et al., J. Antibiotics 41, 702–704 (1988)); Itoh et al., J. Antibiotics 41, 1581–1284 (1988)), Sibiromycin (Leber et al., J. Am. Chem. Soc. 110, 2992–2993 (1988)) und Tomamycin (Arima et al., J. Antibiotics 25, 437–444 (1972)). PBDs entsprechen der folgenden allgemeinen Formel:



**[0002]** Sie unterscheiden sich hinsichtlich Anzahl, Typ und Position der Substituenten, sowohl in Bezug auf ihre aromatischen A- und Pyrrolo-C-Ringe sowie hinsichtlich des Sättigungsgrades des C-Rings. Im B-Ring gibt es entweder ein Imin (N=C), ein Carbinolamin (NH-CH(OH)) oder ein Carbinolaminmethylether (NH-CH(OMe)) an der N10-C11-Position, die das elektrophile Zentrum darstellt, das für DNA-Alkylierung verantwortlich ist. Sämtliche bekannte natürliche Produkte weisen an der chiralen C11a-Position (S)-Konfiguration auf, was ihnen, vom C-Ring aus in Richtung A-Ring gesehen, eine Rechtsdrehung verleiht. Dies verleiht ihnen die geeignete dreidimensionale Form für Isohelizität mit der kleinen Furche von B-Form-DNA, wodurch ab der Bindungsstelle gute Anpassung erzielt wird (Kohn in Antibiotics III, Springer-Verlag, 3–11, New York (1975); Hurley und Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res. 19, 230–273 (1986)). Ihre Fähigkeit zur Bildung eines Addukts ermöglicht es ihnen, das DNA-Prozessing zu unterbrechen, womit sich ihre Verwendung als Antitumormittel ergibt.

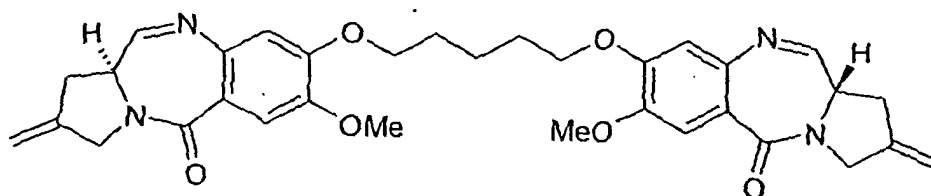
**[0003]** Die Synthese und biologische Aktivität des ungesättigten C2/C2'-Exo-PBD 80 (UP 2001) wurde von Gregson und Mitarbeitern berichtet (Gregson et al., Chem. Commun. 797–798 (1999)).



80 (UP2001)

## Offenbarung der Erfindung

**[0004]** Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel:



**[0005]** Die Verbindung gemäß dem ersten Aspekt ist 1,1'-[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis[(11aS)-7-methoxy-2-methyliden-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on,

**[0006]** Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung einer im ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verbindung in einem Therapieverfahren. Behandelbare Leiden umfassen Erbkrankheiten, einschließlich beispielsweise neoplastische Erkrankungen und Alzheimer-Krankheit, sowie bakterielle, parasitäre und virale Infektionen. Jedes beliebige Leiden, das durch Genexpressionsregulierung behandelbar ist, kann mit den erfindungsgemäßen Verbindungen behandelt werden. Gemäß diesem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung können die bereitgestellten Verbindungen an Individuen verabreicht werden. Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in einer "therapeutisch wirksamen Menge", die ausreicht, dass sich beim Patienten eine Besserung einstellt. Eine solche Besserung kann zumindest die Verbesserung zumindest eines Symptoms darstellen. Die tatsächlich verabreichte Menge sowie die Häufigkeit und der Zeitraum der Verabreichung hängen von der Art und Schwere des Leidens ab. Die Verschreibung der Behandlung, z.B. Dosierungsanweisungen, liegen in der Verantwortung des behandelnden Allgemeinmediziners und anderer Ärzte.

**[0007]** Eine Verbindung kann je nach zu behandelndem Leiden allein oder in Kombination mit anderen Behandlungen, entweder gleichzeitig oder nacheinander verabreicht werden.

**[0008]** Pharmazeutische Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung und zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung können zusätzlich zum Wirkstoff, d.h. einer Verbindung gemäß dem ersten Aspekt, einen pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelträger, Träger, Puffer, Stabilisator oder andere Materialien umfassen, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Solche Materialien sollten nicht-toxisch sein und die Wirksamkeit des Wirkstoffs nicht stören. Die genaue Art des Trägers oder anderer Materialien hängt vom Verabreichungsweg ab, der oral oder mittels Injektion, z.B. kutan, subkutan oder intravenös, sein kann.

**[0009]** Pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung können in Tabletten-, Kapsel-, Pulver- oder flüssiger Form vorliegen. Eine Tablette kann einen festen Träger oder ein Adjuvens umfassen. Flüssige pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen im Allgemeinen einen flüssigen Träger, wie z.B. Wasser, Petroleum, tierische oder pflanzliche Öle, Mineralöl oder synthetisches Öl. Physiologische Kochsalzlösung, Dextrose oder andere Saccharidlösungen oder Glykole, wie z.B. Ethylenglykol, Propylenglykol oder Polyethylenglykol können ebenfalls bereitgestellt sein. Eine Kapsel kann einen festen Träger, wie z.B. Gelatine, umfassen.

**[0010]** Bei intravenösen, kutanen oder subkutanen Injektionen oder Injektionen an der zu behandelnden Stelle liegt der Wirkstoff in Form einer parenteral annehmbaren wässrigen Lösung vor, die pyrogenfrei ist sowie geeigneten pH, geeignete Isotonie und Stabilität aufweist. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung können unter Verwendung von beispielsweise isotonischen Trägern, wie z.B. physiologischer Kochsalzlösung, Ringer-Lösung, Ringer-Laktat, geeignete Lösungen herstellen. Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Puffer, Antioxidanzien und/oder andere Additive können je nach Bedarf zugesetzt werden.

**[0011]** Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung gemäß dem ersten Aspekt und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünner enthält. Die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzungen wird in Bezug auf obigen zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung beschrieben.

**[0012]** Ein vierter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung einer Verbindung gemäß dem ersten Aspekt bereit, um ein Medikament zur Behandlung einer Erbkrankheit, vorzugsweise einer Proliferationserkrankung, herzustellen. Die Verbindung der Formel kann zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünner bereitgestellt werden. Die Verbindungen können zur selektiven Abtötung von oxischen und hypoxischen Tumorzellen in Verfahren zur Behandlung von Krebserkrankungen, beispielsweise Leukämien und insbesondere soliden Krebsarten, wie z.B. Kolon-, ZNS-, Nieren- und Lungentumoren, ein-

schließlich kleinzelliger Bronchialkarzinome und von Melanomen, verwendet werden. Insbesondere können Verbindungen gemäß dem ersten Aspekt zur selektiven Abtötung von Lungen-, Kolon-, und ZNS-Tumoren sowie von Melanomen verwendet werden.

**[0013]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung einer Verbindung gemäß dem ersten Aspekt zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer viralen, parasitären oder bakteriellen Infektion bereit. Die Herstellung eines Medikaments wird in Bezug auf den obigen fünften Aspekt der vorliegenden Erfindung beschrieben.

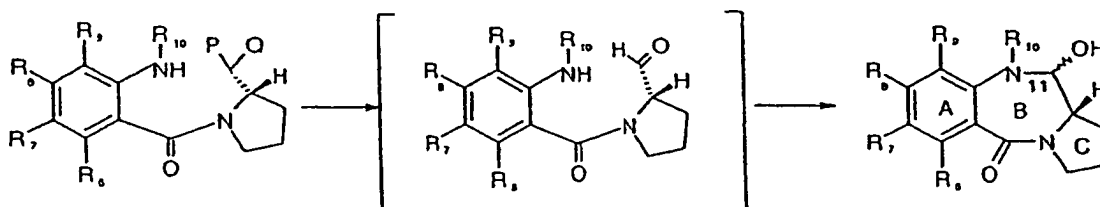
**[0014]** In weiteren Aspekten stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Verbindungen gemäß dem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung bereit.

**[0015]** Im Folgenden werden Aspekte der Erfindung unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben, worin:

**[0016]** Fig. 1 ein Syntheseweg für eine Verbindung der vorliegenden Erfindung ist.

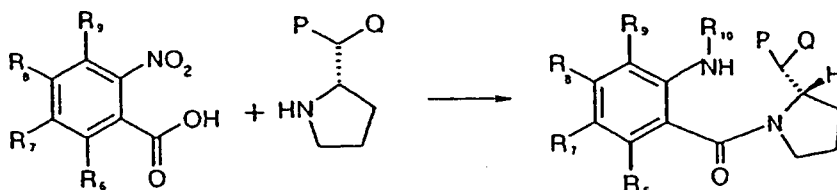
#### Bevorzugte allgemeine Synthesestrategien

**[0017]** Ein Schlüsselschritt in einem bevorzugten Weg zu Verbindungen der vorliegenden Erfindung ist eine Zyklisierung zur Herstellung des B-Rings, welche die Bildung eines Aldehyds (oder eines funktionellen Äquivalents davon) an der späteren 11-Position und einen Angriff darauf durch den Pro-N10-Stickstoff umfasst:



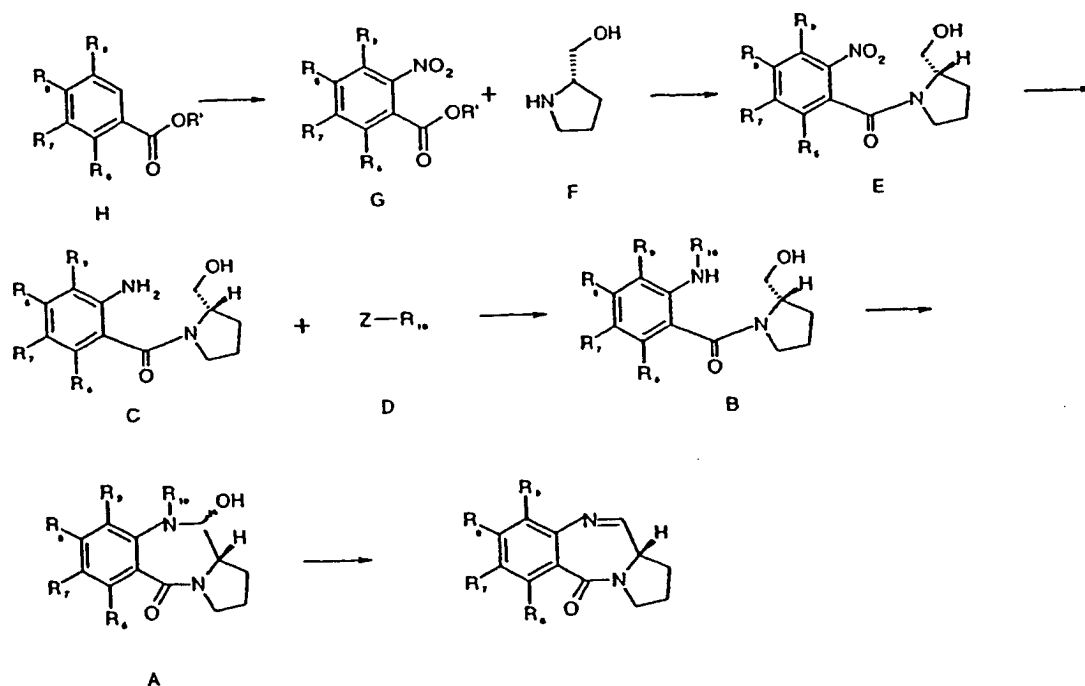
**[0018]** In dieser Struktur sind C-Ring-Substitutionen oder -Unsättigungen nicht dargestellt.  $R_8$  steht in Verbindungen der Formel IV für  $O(CH_2)_nCH_2COR'_8$ .  $R_{10}$  ist eine Stickstoffschutzgruppe, vorzugsweise mit einer Carbamatfunktionalität, die an den Stickstoff des PBD gebunden ist. Das "maskierte Aldehyd" -CPQ kann ein Acetal oder Thioacetal (möglicherweise zyklisch) sein; in diesem Fall macht die Zyklisierung eine Demaskierung erforderlich. Alternativ dazu kann das maskierte Aldehyd ein Aldehydvorläufer, wie z.B. der Alkohol -CHOH sein; in diesem Fall umfasst die Reaktion eine Oxidation, z.B. mit TPAP oder DMSO (Swern-Oxidation).

**[0019]** Die maskierte Aldehydverbindung kann durch Kondensieren eines entsprechenden 2-substituierten Pyrrolidins mit einer 2-Nitrobenzoesäure hergestellt werden:



**[0020]** Die Nitrogruppe kann anschließend zu  $-NH_2$  reduziert und durch Umsetzung mit einem geeigneten Reagens, z.B. eines Chlorformats, geschützt werden, wodurch die entfernbare Stickstoffschutzgruppe im Syntheseweg bereitgestellt wird.

**[0021]** Ein Verfahren, welches den Oxidations-Zyklisierungsvorgang umfasst, ist in Schema 1 veranschaulicht (eine alternative Art der Zyklisierung wird später unter Bezug auf Schema 2 beschrieben).



Schema 1

**[0022]** Die Imin/Carbinolamin-Bindung im PBD (A) kann durch Standardverfahren geschützt werden, um die gewünschte Verbindung zu ergeben; wenn beispielsweise  $R_{10}$  Alloc ist, wird das Entschützen mittels Palladium durchgeführt, um die N10-Schutzgruppe zu entfernen, gefolgt von Wasserabspaltung, um das Imin zu erhalten.

**[0023]** Das Aussetzen von Alkohol (B) (worin der Pro-N-10-Stickstoff im Allgemeinen als Carbamat geschützt ist) gegenüber Tetrapropylammoniumper Ruthenat (TPAP)/N-Methylmorpholin-N-oxid (NMO) über A4-Sieben führt zu Oxidation, begleitet von spontanem B-Ringschluss, um das gewünschte Produkt zu ergeben. Der TPAP/NMO-Oxidationsvorgang eignet sich insbesondere für Reaktionen in kleinerem Maßstab während sich Oxidationsverfahren auf DMSO-Basis, insbesondere Swern-Oxidationen, für die Arbeit im größeren Maßstab (z.B. > 1 g) besser eignen.

**[0024]** Der nichtzyklisierte Alkohol (B) kann durch Umsetzung eines Stickstoffschutzreagens der Formel D, das vorzugsweise ein Chlorformiat oder Säurechlorid ist, mit einer Lösung des Aminoalkohols C, im Allgemeinen in Lösung, im Allgemeinen in Gegenwart einer Base wie Pyridin (vorzugsweise von 2 Äquivalenten davon) bei mittlerer Temperatur (z.B. 0 °C) hergestellt werden. Unter diesen Bedingungen wird üblicherweise wenig oder gar keine Acylierung beobachtet.

**[0025]** Der ausschlaggebende Aminoalkohol C kann durch Reduktion der entsprechenden Nitroverbindung E durch Auswahl eines Verfahrens, welches das übrige Molekül intakt lässt, hergestellt werden. Die Behandlung von E mit Zinn(II)-chlorid in einem geeigneten Lösungsmittel, wie z.B. Methanol unter Rückfluss, ergibt im Allgemeinen nach Entfernen der Zinnsalze das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute.

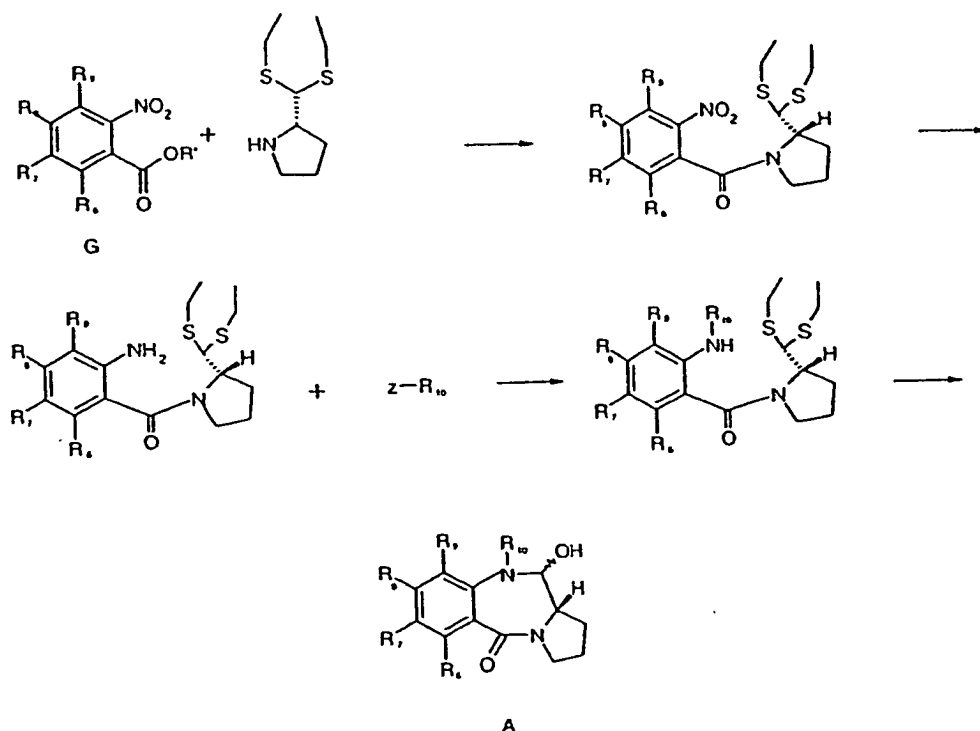
**[0026]** Das Aussetzen von E gegenüber Hydrazin/Raney-Nickel verhindert die Bildung von Zinnsalzen und kann zu höheren Ausbeuten von C führen, wobei dieses Verfahren weniger verträglich mit der Reihe von möglichen C-Ring- und A-Ringsubstitutionen ist. Wenn beispielsweise eine C-Ring-Unsättigung (entweder im Ring selbst oder in  $R_2$  oder  $R_3$ ) gibt, ist dieses Verfahren mitunter ungeeignet.

**[0027]** Die Nitroverbindung der Formel E kann durch Anbindung des geeigneten o-Nitrobenzoylchlorids an eine Verbindung der Formel F, z.B. in Gegenwart von  $K_2CO_3$ , bei -25 °C unter Stickstoffatmosphäre, hergestellt werden. Verbindungen der Formel F können ohne weiteres beispielsweise durch Olefinierung des aus L-trans-Hydroxyprolin abgeleiteten Ketons hergestellt werden. Das Ketonzwischenprodukt kann auch durch Überführung in das Enoltriflat zur Verwendung in Palladium-vermittelten Kupplungsreaktionen genutzt werden.

**[0028]** Das o-Nitrobenzoylchlorid wird aus der o-Nitrobenzoesäure (oder dem Alkylester nach Hydrolyse) der Formel G synthetisiert, die ihrerseits aus dem Vanillinsäure(oder ihrem Alkylester-) Derivat H hergestellt wird. Viele davon sind im Handel erhältlich und manche von Althuis, T.H. und Hess, H.J. in J. Medicinal Chem. 20(1),

146-266 (1977) offenbart.

## Alternative Zyklisierung (Schema 2)



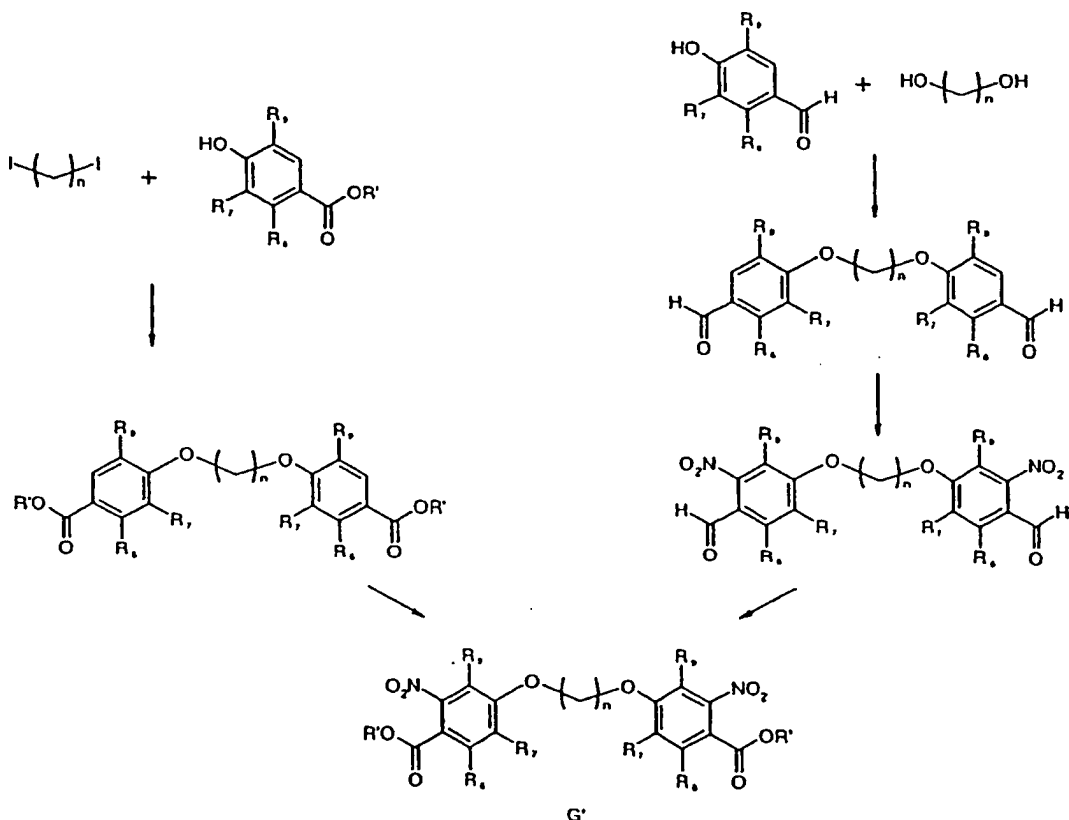
Schema 2

**[0029]** In Schema 1 war der letzte oder vorletzte Schritt eine oxidative Zyklisierung. Eine Alternative mittels Thioacetalkupplung wird in Schema 2 gezeigt. Quecksilber-vermittelte Demaskierung verursacht Zyklisierung der geschützten PBD-Verbindung (A).

**[0030]** Die Thioacetalverbindung kann wie in Schema 2 gezeigt hergestellt werden: der Thioacetal-geschützte C-Ring [hergestellt durch ein in der Literatur beschriebenes Verfahren, nämlich durch das von Langley, D.R. und Thurston, D.E. in J. Organic Chemistry 52, 91-97 (1987) beschriebene Verfahren] wird durch ein in der Literatur beschriebenes Verfahren an die o-Nitrobenzoesäure (oder den Alkylester nach Hydrolyse) (G) gebunden. Die resultierende Nitroverbindung kann aufgrund der Thioacetalgruppe nicht durch Hydrierung reduziert werden, so dass zum Erhalt des Amins das Zinn(II)-chlorid-Verfahren eingesetzt wird. Dies wird sodann, beispielsweise mit einem Chlorformiat oder Säurechlorid, wie z.B. 2,2,2-Trichlorethylchlorformiat, N-geschützt.

**[0031]** Acetalhaltige C-Ringe können als Alternative zu diesem Weg verwendet werden, wobei das Entschützen andere Verfahren, einschließlich saurer Bedingungen, umfasst.

## Dimersynthese(Schema 3)



Schema 3

**[0032]** PBD-Dimere können unter Anwendung der für die Synthese von geschützten PBD-Monomeren entwickelten Strategie synthetisiert werden. Die in Schema 3 veranschaulichten Synthesewege zeigen Verbindungen, wenn der Dimerlinker die Formel  $-O-(CH_2)_n-O-$  aufweist. Die Dimerbildung wird üblicherweise durchgeführt, um eine Bis(nitrosäure)  $G'$  zu bilden. Diese Verbindung kann anschließend als Verbindung  $G$  entweder in obigem Schema 1 oder Schema 2 behandelt werden.

**[0033]** Die Bis(nitrosäure)  $G'$  kann durch Nitrieren (z.B. mit 70%iger Salpetersäure) der Bis(carbonsäure) erhalten werden. Diese kann durch Alkylierung von zwei Äquivalenten der entsprechenden Benzoesäure mit dem geeigneten Diiodalkan unter basischen Bedingungen synthetisiert werden. Viele Benzoesäuren sind im Handel erhältlich, und andere können durch herkömmliche Verfahren synthetisiert werden. Alternativ dazu können die entsprechenden Benzoesäureester durch eine Mitsunobo-Veretherung mit einem geeigneten Alkandiol, gefolgt von Nitrierung und anschließender Hydrolyse (nicht dargestellt) miteinander verbunden werden.

**[0034]** Schützen der Pro-N10-Position auf der Komponente, die den A-Ring bildet, vor dem Anbinden der Komponente, die den C-Ring bildet, stellt gegenüber den oben ausgeführten einen alternativen Synthesansatz dar.

## Bevorzugte Synthesestrategien für Verbindungen

**[0035]** Der Syntheseweg aus Schema 1 ist allgemein auf die Verbindung der vorliegenden Erfindung anwendbar.

**[0036]** C2-ungesättigte PBDs können aus ihren N10-Carbamat-geschützten Vorläufern synthetisiert werden. Üblicherweise kann Palladium-katalysierte Entfernung von Allylcarbamat angewandt werden, um das N10-C11-Imin zu bilden, ohne die wichtige C2-Unsättigung zu beeinträchtigen. Alternativ dazu kann das Paar Cadmium-Blei eingesetzt werden, um ein N10-2,2,2-Trichlorethylcarbamat vom geschützten PBD abzuspalten.

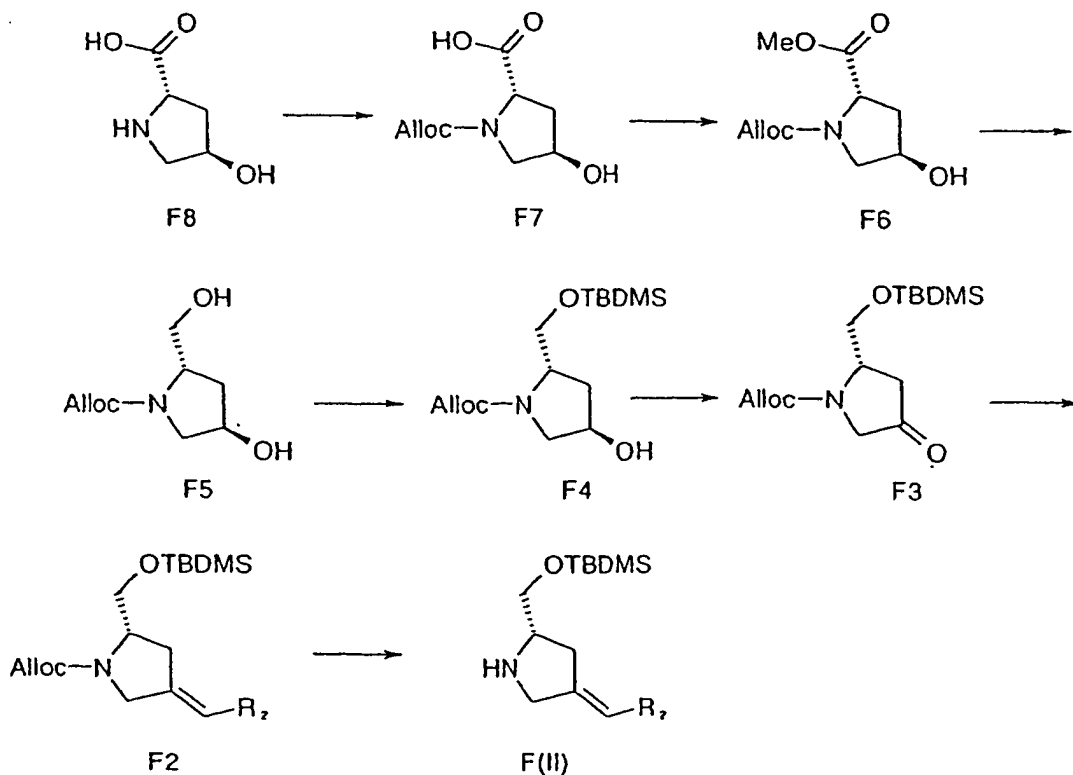
**[0037]** Durch die Reduktion der Nitroverbindung  $E$  mit Zinn(II)-chlorid wie in Schema 1 gezeigt wird die

C2-Unsättigung beibehalten, obwohl das Isolieren des Anilins C von den Zinnsalzen problematisch sein kann.

**[0038]** Die Verbindung der Formel F kann in ihrer TBDMS-geschützten Form verwendet werden, weswegen ein Entschützungs-schritt eingebaut werden muss, um die Aminoalkoholverbindung E herzustellen.

**[0039]** Der TBDMS-Ether vom Typ E, der das Produkt der Kupplung der TBDMS-geschützten Verbindung an das geeignete o-Nitrobenzoylchlorid ist, kann mit AcOH:THF:H<sub>2</sub>O (3:1:1) behandelt werden. TBAF erwies sich als ungeeignet für diese Umwandlung, da die Reaktionsprodukte rasch abgebaut werden.

**[0040]** Verbindungen F(II), die C-Ringe bereitstellen, können wie in Schema 4 gezeigt erhalten werden.



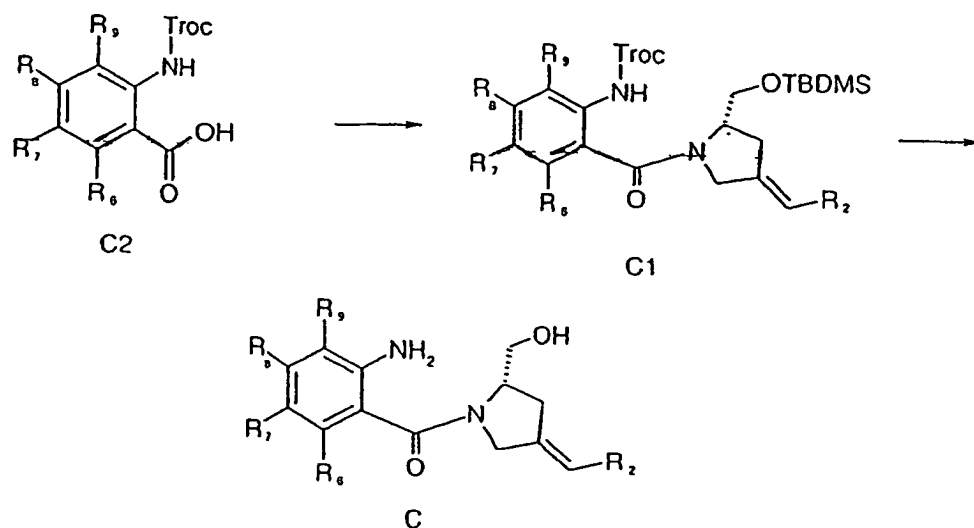
Schema 4

**[0041]** Im Handel erhältliches trans-4-Hydroxy-L-prolin F8 kann N-Alloc-geschützt werden, um das Allylcarbamamat F7 zu ergeben, das anschließend unter Standardbedingungen verestert werden kann. Hydridreduktion des Esters F6 ergibt das Diol F5. Selektive TBDMS-Schützung des Diols ergibt einen Silylether F4, der anschließend mittels Swern- oder TPAP-Oxidation oxidiert werden kann, um das Keton F3 bereitzustellen.

**[0042]** Die in F2 enthaltene C2-Olefinfunktionalität kann eingeführt werden, indem mit dem Keton F3 eine Wittig-Reaktion durchgeführt wird. Palladium-vermittelte Abspaltung der N-Alloc-Schutzgruppe (Dangles O.; Guibé, F.; Balavoine, G.; Lavielle, S.; Marquet, A.; J. Org. Chem. 52, 4984 (1987)) ergibt Verbindung F(II).



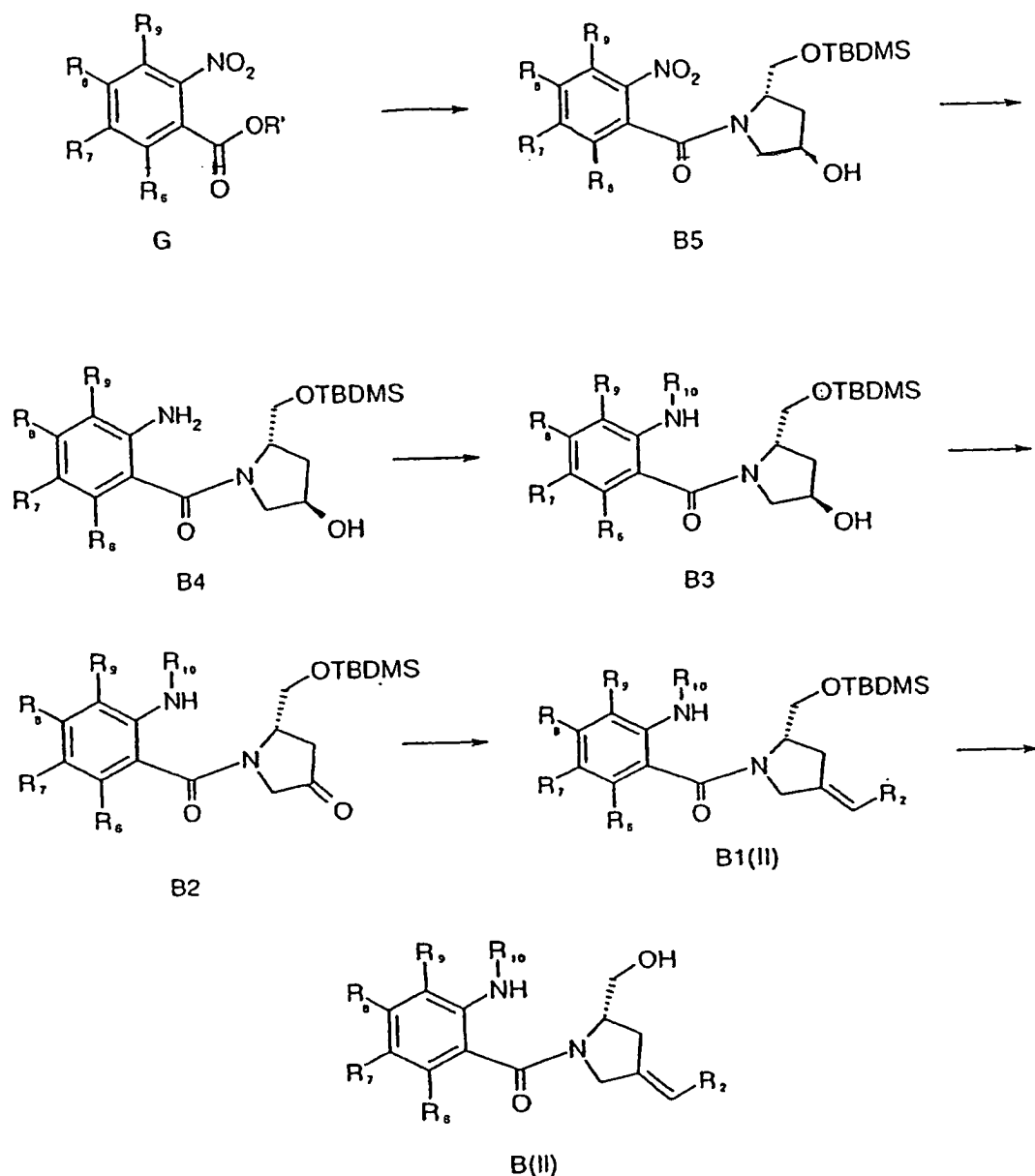
## Alternativer Weg zu Verbindung C



Schema 5

**[0043]** Ein alternativer Weg zu Verbindung C ist entwickelt worden (Schema 5). Das Amid der Formel C1 kann durch Ausbildung des Säurechlorids einer N-Troc-geschützten Anthranilsäure vom C2-Typ synthetisiert werden. Interessanterweise bilden N-Troc-geschützte Anthranilsäuren keine Isatosäureanhydride, was Amidbildungsreaktionen mit Aminen vom F(II)-Typ ermöglicht. Die gleichzeitige TBAF-vermittelte Abspaltung des 2,2,2-Trichlorethylcarbamats und der TBDMS-Gruppen von C1 kann den wichtigen Aminoalkohol C bereitstellen.

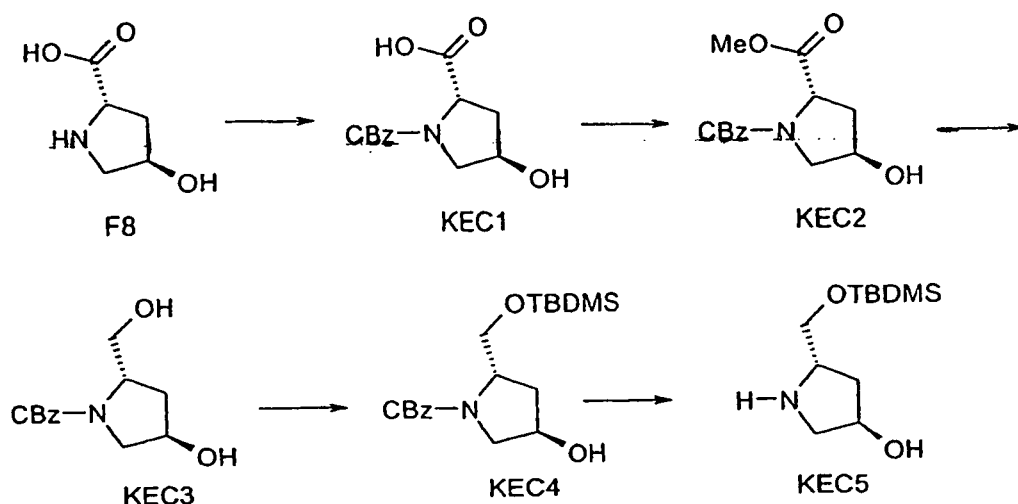
## Alternativer Weg



Schema 6

**[0044]** Ein linearer Weg zur Synthese der Verbindung B aus Schema 1 ist entwickelt worden, wodurch die Herstellung der C2-ungesättigten PBDs in größerem Maßstab ermöglicht wird, wie dies in Schema 6 gezeigt wird. Die TBAF-vermittelte Abspaltung der TBDMS-Gruppe kann verwendet werden, um B(II) aus B1(II) herzustellen. Die in B1(II) enthaltene wichtige C2-Unsättigung kann eingeführt werden, indem die Wittig-Olefinierungsreaktion mit einem Keton vom B2-Typ durchgeführt wird. Swern-Oxidation des sekundären Alkohols B3 kann verwendet werden, um das Keton B2 bereitzustellen. Das Carbamat-geschützte Anilin B3 kann in zwei Stufen aus der Nitroverbindung B5 hergestellt werden. Zuerst kann die Nitrogruppe mittels des Raney-Nickel/Hydrazin-Verfahrens zum Anilin reduziert werden, da einer Verbindung vom B5-Typ die C2-Unsättigung fehlt. Dieses Verfahren ist vorteilhafter als das Zinn(II)-chlorid-Verfahren, da das Produkt leichter zu isolieren ist. Das Anilin B4 kann anschließend ohne nennenswerte Carbonatbildung am C2-Sauerstoff in hoher Ausbeute N-Carbamat-geschützt werden.

**[0045]** Ein Amid vom B5-Typ kann durch Anbinden eines Säurechlorids vom G-Typ an das Schlüssel-Amin KEC5 synthetisiert werden (Schema 7).



Schema 7

**[0046]** Insgesamt weist dieser Weg gegenüber dem vorherigen mehrere Vorteile auf, was dazu führt, dass eine Herstellung der C2/C3-endo-ungesättigten PBDs in größerem Maßstab möglich ist. Erstens ermöglicht katalytische Hydrierung von KEC4 eine Herstellung des wichtigen Zwischenprodukts KEC5 in größerem Maßstab, und zweitens kann dieser effizientere Nitroreduktionsschritt mit einem Zwischenprodukt durchgeführt werden, das keine C2-Unsättigung aufweist. Wichtig ist, dass die während der Horner-Emmons-Reaktion beobachtete Wanderung der Doppelbindung spontan ist, so dass kein überschüssiges Natriumhydrid erforderlich ist. Diese Wanderung der Doppelbindung ist auch von anderen beobachtet worden (Leimgruber, W.; Batcho, A.D.; Czajkowski, R.C., J. Am. Soc. 90, 5641 (1968)).

**[0047]** Parr-Hydrierung von KEC4 zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe ermöglichte eine Synthese des wichtigen Aminozwischenprodukts KEC5 in großem Maßstab. Der TBDMS-Ether KEC4 wurde durch selektive Silylierung des primären Alkohols KEC3 hergestellt, was unter Verwendung von DBU als Silylüberträger erfolgte. Das Diol KEC3 wurde durch Hydridreduktion des Esters KEC2 erhalten, der seinerseits aus der Carbonsäure KEC1 synthetisiert wurde. N-Cbz-Schutz von trans-4-Hydroxy-L-prolin (F4) wurde durch Anpassung eines in der Literatur beschriebenen Verfahrens erzielt (Bridges, R. J.; Stanley, M.S.; Anderson, M.W.; Cotman, C. W.; Chamberlain, R. A. J. Med. Chem. 34, 717 (1991)).

**[0048]** Bei der Dimersynthese können die oben dargelegten Wege gegenüber den allgemeinen Synthesestrategien bevorzugt verwendet werden. Insbesondere kann die Stickstoff-Schutzgruppe vorteilhafterweise ein Carbamat sein, da Schutzgruppen von diesem Typ in der letzten Stufe durch eine Reihe von Verfahren entfernt werden können, die die wichtige C2-Unsättigung im Allgemeinen nicht beeinträchtigen.

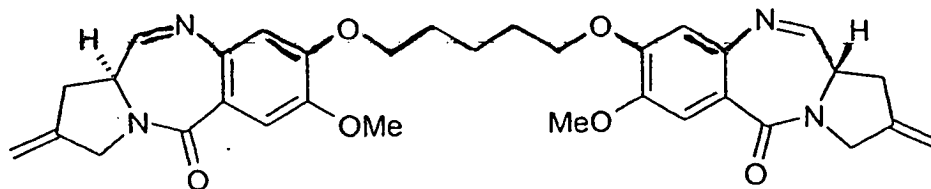
#### Allgemeine Versuchsverfahren

**[0049]** Schmelzpunkte (Fp.) wurden auf einer digitalen Schmelzpunktmessvorrichtung Gallenkamp P1384 bestimmt und sind nicht korrigiert. Infrarot- (IR-) Spektren wurden unter Verwendung eines Perkin-Elmer-297-Spektralphotometers aufgenommen. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden auf einem Jeol-GSX-FT-NMR-Spektrometer mit 270 MHz, das bei 20 °C  $\pm$  1 °C betrieben wurde, gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind in Teilen pro Million Teile ( $\delta$ , ppm) im Tieffeld zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben. Die Spinmultiplizitäten werden Folgendermaßen beschrieben: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Doppeldublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentuplett) oder m (Multipllett). Die Massenspektren (MS) wurden mit einem Jeol-JMS-DX-303-GC-Massenspektrometer (EI-Modus: 70eV, Quelle 117–147 °C) aufgezeichnet. Die genauen Molekülmassen (HRMS) wurden durch Peakübereinstimmung mit Perfluorkerosin (PFK) als interner Massemarker bestimmt, und FAB-Massenspektren wurden aus einer Glycerin/Thioglycerin/Trifluoressigsäure- (1:1:0,1) Matrix mit einer Sourcedtemperatur von 180 °C erhalten. Optische Drehungen an der Na-D-Linie wurde bei Umgebungstemperatur mittels Perkin-Elmer-141-Polarimeter erhalten. Die Analyseergebnisse lagen im Allgemeinen innerhalb von  $\pm$  0,2 % der theoretischen Werte. Flash-Chromatographie wurde mit einem Aldrich-Flash-Chromatographen "Kieselgel-60" (E. Merck, 230–400 mesh) durchgeführt. Dünnschichtchromatographie (DC) wurde mittels GF<sub>254</sub>-Kieselgel (mit Fluoreszenzindikator) auf Glasplatten durchgeführt. Sämtliche Lösungsmittel und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Aldrich Chemical Company Ltd. bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt, wie sie bereitgestellt wurden. Wasserfreie Lösungsmittel durch Destillation unter Stickstoffatmosphäre in Gegenwart eines geeigneten

Trocknungsmittels hergestellt und über 4Å-Molekularsieben oder Natriumdraht gelagert. Petrolether bezieht sich auf die bei 40–60 °C siedende Fraktion.

### Beispiele

Beispiel 1: Synthese von 1,1'-[[Pentan-1,5-diyl]dioxy]bis[(11aS)-7-methoxy-2-methyliden-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-uyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (218) (siehe Fig. 1a/b)



### Herstellung des Nitrodimerkerns

#### 1',5'-Bis[2-methoxy-4-(methoxycarbonyl)phenoxy]pentan (208)

**[0050]** Reines Diethylazidodicarboxylat (19,02 ml, 21,04 g, 120,8 mmol) wurde 30 Minuten lang zu einer gerührten Lösung von Methylvanillat (207) (20 g, 109,8 mmol) und Triphenylphosphin (43,2 g, 164,7 mmol) in wasserfreiem THF (400 ml) zugetropft und das Reaktionsgemisch 1 Stunde lang bei 0 °C rühren gelassen. Zum kalten Reaktionsgemisch wurde 20 Minuten lang eine Lösung von 1,5-Pentandiol (3,83 ml, 4,03 g, 53,0 mmol) in THF (4 ml) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen, und das ausgefallene Produkt (208) wurde mittels Vakuumfiltration gewonnen. Verdünnung des Filtrats mit Methanol führte dazu, dass weiteres Produkt (208) ausfiel. Der vereinigte Niederschlag (12,3 g, 52 % bezogen auf Pentandiol) wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt:

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.65 (dd, 2H, J = 2.01, 8.42 Hz), 7.54 (d, 2H, J = 2.01 Hz), 6.87 (d, 2H, J = 8.42 Hz), 4.10 (t, 4H, J = 6.59 Hz), 3.90 (s, 6H), 3.89 (s, 6H), 2.10–1.90 (m, 4H), 1.85–1.26 (m, 2H).

#### 1',5'-Bis[2-methoxy-4-(methoxycarbonyl)-5-nitrophenoxy]pentan (209)

**[0051]** Festes Kupfer(II)-nitrat-trihydrat (16,79 g, 69,5 mmol) wurde zu einer gerührten Lösung des Bisesters (208) (12 g, 27,8 mmol) in Essigsäureanhydrid (73 ml) bei 0 °C langsam zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde lang bei 0 °C rühren gelassen, das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen gelassen; dabei trat eine leichte Exothermie auf ca. 40 °C, begleitet von NO<sub>2</sub>-Bildung auf. Nachdem die Exothermie nachgelassen hatte, wurde weitere 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Eiswasser gegossen und die wässrige Suspension 1 Stunde lang rühren gelassen. Der resultierende gelbe Niederschlag wurde mittels Vakuumfiltration gewonnen und an der Luft getrocknet, was die gewünschte Bisnitroverbindung (209) (14,23 g, 98 %) ergab:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, + DMSO) δ 7.45 (s, 2H), 7.09 (s, 2H), 4.14 (t, 4H, J = 6.31 Hz), 3.97 (s, 6H), 3.90 (s, 6H), 2.20–1.94 (m, 4H), 1.75–1.70 (m, 2H).

#### 1',5'-Bis(4-carboxy-2-methoxy-5-nitrophenoxy)pentan (210)

**[0052]** Eine Suspension des Esters 209 (9,0 g, 17,2 mmol) in wässrigem Natriumhydroxid (1 M, 180 ml) und THF (180 ml) wurde rühren gelassen, bis (nach 2 Tagen) eine homogene Lösung erhalten war. THF wurde unter reduziertem Druck abgedampft und die resultierende wässrige Suspension filtriert, um jegliches nichtumgesetztes Ausgangsmaterial zu entfernen. Das Filtrat wurde auf einen pH von 1 eingestellt, das ausgefallene Produkt abfiltriert und luftgetrocknet, was die gewünschte Bissäure (210) (8,88 g) ergab. Aufgrund des Einschlusses des Natriumsalzes der Säure wurde eine höhere Ausbeute als die theoretische erzielt. Das Salz kann durch Lösen des gesamten Materials in THF und Abfiltrieren des unlöslichen Materials entfernt werden:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.39 (s, 2H), 7.16 (s, 2H), 4.12 (t, 4H, J = 6.59 Hz), 3.95 (s, 6H), 2.00–1.85 (m, 4H), 1.75–1.67 (m, 2H).

## Zusammenstellung des Bisketonzwischenprodukts

1,1'-[[[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis[2-nitro-5-methoxy-1,4-phenylen)carbonyl]]bis[(2S,4R)-2-t-butyldimethylsilyloxymethyl-4-hydroxypyrrolidin] (211)

**[0053]** Eine katalytische Menge DMF (5 Tropfen) wurde zu einer gerührten Suspension der Säure 210 (5,39 g, 10,9 mmol) und von Oxalylchlorid (3,47 g, 2,38 ml, 27,3 mmol) in wasserfreiem THF (50 ml) zugesetzt. Es wurde ein anfängliches Aufschäumen beobachtet, gefolgt von der Bildung einer homogenen Lösung, wobei sich jedoch nach Rühren über Nacht eine Suspension des neu gebildeten Säurechlorids ausgebildet hatte. Überschüssiges THF und Oxalylchlorid wurden durch Rotationsverdampfen unter reduziertem Druck entfernt, und das Säurechlorid wurde in frischem THF (49 ml) resuspendiert. Die Säurechloridlösung wurde zu einer Lösung von (2S, 4R)-2-t-Butyldimethylsilyloxymethyl-4-hydroxypyrrolidin (2) (6,3 g, 27,3 mmol), Triethylamin (4,42 g, 6,09 ml, 43,7 mmol) und Wasser (1,47 ml) in THF (33 ml) bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und weitere 3 Stunden lang gerührt. Überschüssiges THF wurde mittels Rotationsverdampfen unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand zwischen Wasser (300 ml) und Ethylacetat (300 ml) verteilt. Die Phasen wurden sich trennen gelassen und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 × 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit Ammoniumchlorid (150 ml), gesättigtem Natriumbicarbonat (150 ml) und Kochsalzlösung (150 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Filtration, gefolgt von Rotationsverdampfen unter reduziertem Druck ergab das Rohprodukt als dunkles Öl. Das Rohprodukt wurde Flash-Säulenchromatographie (3 % Methanol, 97 % Chloroform) unterzogen, und Entfernung von überschüssigem Eluens führte zur Isolierung von (211) (3,70 g, 37 % Ausbeute):

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.65 (s, 2H), 6.77 (s, 2H), 4.52 (bs, 2H), 4.40 (bs, 2H), 4.17–4.10 (m, 6H), 3.92 (s, 6H), 3.77 (d, 2H, J = 10.26 Hz), 3.32 (td, 2H, J = 4.40, 21.35 Hz), 3.08 (d, 2H, J = 11.35 Hz), 2.37–2.27 (m, 2H), 2.10–2.00 (m, 6H), 1.75–1.60 (m, 2H), 0.91 (s, 18H), 0.10 (s, 12H).

1,1'-[[[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis[2-amino-5-methoxy-1,4-phenylen)carbonyl]]bis[(2S,4R)-2-t-butyldimethylsilyloxymethyl-4-hydroxypyrrolidin] (212)

**[0054]** Eine Methanollösung von Hydrazinhydrat (1,25 ml, 1,29 g, 40,2 mmol Hydrazin, 20 ml Methanol) wurde zu einer Lösung der Bisnitroverbindung 211 (3,6 g, 3,91 mmol) in Methanol (68 ml) zugegeben, wobei vorsichtig über Raney-Nickel (510 mg einer dicken Aufschlämmung) rückflusserhitzt wurde. Nach 5 Minuten Rückfluss ergab ein DC (10 % MeOH, 90 % Chloroform), dass das Ausgangsmaterial nicht vollständig verbraucht war. Das Reaktionsgemisch wurde mit zusätzlichem Raney-Nickel (ca. 510 mg) und Hydrazin (1,25 ml) in Methanol (20 ml) versetzt, was zum vollständigen Verbrauch des Ausgangsmaterials führte. Überschüssiges Raney-Nickel wurde zum Reaktionsgemisch zugesetzt, um nichtumgesetztes Hydrazinhydrat zu zersetzen, wonach das Reaktionsgemisch abkühlen gelassen wurde. Das Reaktionsgemisch wurde durch Celite filtriert, um überschüssiges Raney-Nickel zu entfernen, und das Filterkissen wurde mit zusätzlichem Methanol gewaschen (Achtung! Raney-Nickel ist luftentzündlich; das Filterkissen sollte nicht trocknen gelassen werden; zur Zerstörung des Nickels sollte konzentrierte HCl verwendet werden). Das vereinigte Filtrat wurde mittels Rotationsverdampfung unter reduziertem Druck eingedampft und der Rückstand in Dichlormethan wiedergelöst. Die Dichlormethanolösung wurde (zur Entfernung des zusammen mit dem Hydrazin eingeführten Wassers) über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft, um das Produkt (212) als Schaum (3,37 g, 91 %) zu ergeben:

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.69 (s, 2H); 6.24 (s, 2H), 4.40–3.40 (m, 28H), 2.40–1.60 (m, 10H), 0.88 (s, 18H), 0.03 (s, 12H).

1,1'-[[[(Pentan-1,5-dioxy)dioxy]bis[2-amino-N-allyloxycarbonyl-5-methoxy-1,4-phenylen)carbonyl]]bis[(2S,4R)-2-t-butyldimethylsilyloxymethyl-4-hydroxypyrrolidin] (213)

**[0055]** Eine Lösung von Allylchlorformiat (0,806 ml, 0,916 g, 7,6 mmol) in trockenem Dichlormethan (63 ml) wurde zu einer Lösung von Bisamin 212 (3,27 g, 3,8 mmol) und Pyridin (1,26 g, 1,29 ml, 15,9 mmol) in Dichlormethan (128 ml) bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und 16 Stunden lang gerührt. Zu diesem Zeitpunkt ergab ein DC (10 % MeOH, 90 % Chloroform), dass die Reaktion beendet war. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan (40 ml) verdünnt und mit gesättigtem Kupfer(II)-sulfat (2 × 140 ml), Wasser (120 ml) und gesättigtem Natriumchlorid (120 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingedampft, was 213 als Schaum (3,60 g, 92 %) ergab:

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.87 (bs, 2H); 7.66 (s, 2H), 6.77 (s, 2H), 6.05–5.80 (m, 2H), 5.40–5.15 (m, 4H), 4.70–4.50 (m, 6H), 4.38 (bs, 2H), 4.20–4.00 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.70–3.40 (m, 8H), 2.40–2.20 (m, 2H),

2.10–1.80 (m, 6H), 1.75–1.55 (m, 2H), 0.89 (s, 18H) 0.04 (s, 12H).

1,1'-[[[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis[2-amino-N-allyloxycarbonyl-5-methoxy-1,4-phenylen)carbonyl]]bis[(2S)-2-t-butyldimethylsilyloxymethyl-4-oxo-pyrrolidin] (214)

**[0056]** Eine Lösung von Dimethylsulfoxid (1,47 ml, 1,62 g, 20,7 mmol) in trockenem Dichlormethan (32 ml) wurde 45 Minuten lang zu einer gerührten Lösung von Oxalylchlorid (5,18 ml einer 2 M Lösung in Dichlormethan, 10,35 mmol) bei –60 °C unter Stickstoffatmosphäre zugetropft. Nach 30-minütigem Rühren bei –50 °C wurde eine Lösung des Bisalkohols 213 (3,55 g, 3,45 mmol) in Dichlormethan (53 ml) über einen Zeitraum von 50 Minuten zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde vor dem Zutropfen einer Lösung von Triethylamin (4,75 g, 6,54 ml, 46,9 mmol) in Dichlormethan (27 ml) 30 Minuten lang bei –60 °C rühren gelassen. Anschließend wurde weitere 45 Minuten lang bei –60 °C gerührt und dann auf 0 °C erwärmen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan (20 ml) verdünnt, mit kalter 1 M HCl (2 × 100 ml) sowie gesättigtem Natriumchlorid (100 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Entfernung des überschüssigen Lösungsmittels ergab das rohe Bisketon, das mittels Flash-Säulenchromatographie (50 % Ethylacetat, 50 % Petrolether (40–60 °C)) gereinigt wurde, wodurch das reine Bisketon (214) als blassgelber Schaum (2,54 g, 72 %) erhalten wurde:

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.69 (bs, 2H), 7.78 (s, 2H), 6.75 (s, 2H), 6.05–5.80 (m, 2H), 5.40–5.20 (m, 4H), 4.65–4.60 (m, 4H), 4.20–3.60 (m, 20H), 2.74 (dd, 2H, J = 9.25, 18.1 Hz), 2.51 (d, 2H, J = 17.4 Hz), 2.00–1.90 (m, 4H), 1.75–1.65 (m, 2H), 0.87 (s, 18H), 0.05 (s, 12H).

#### Weiterentwicklung des Bisketons und Herstellung des Zielmoleküls

1,1'-[[[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis[2-amino-N-allyloxycarbonyl-5-methoxy-1,4-phenylen)carbonyl]]bis[(2S)-2-t-butyldimethylsilyloxymethyl-4-methyliden-2,3-dihydropyrrol] (215)

**[0057]** Eine Lösung von Kalium-t-butoxid in trockenem THF (0,5 M, 25,2 ml, 12,6 mmol) wurde zu einer Lösung von Methyltriphenylphosphoniumbromid (4,50 g, 12,6 mmol) in trockenem THF (15 ml) zugetropft. Die resultierende gelbe Ylidsuspension wurde vor Zugabe einer Lösung des Bisketons 214 (2,48 g, 2,42 mmol) in THF (10 ml) bei 10 °C 2 Stunden lang bei 0 °C rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und 1 weitere Stunde lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Ethylacetat (100 ml) und Wasser (100 ml) verteilt und die organische Phase mit gesättigtem Natriumchlorid (200 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Entfernung des überschüssigen Lösungsmittels ergab ein braunes Öl, das Flash-Säulenchromatographie (50 % Ethylacetat, 50 % Petrolether (40–60 °C)) unterzogen wurde, um das Produkt (215) als gelbes Glas (865 mg, 35 %) zu ergeben:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.90 (bs, 2H), 7.83 (s, 2H), 6.82 (s, 2H), 6.05–5.90 (m, 2H), 5.40–5.20 (m, 4H), 4.99 (bs, 2H), 4.91 (bs, 2H), 4.65–4.60 (m, 4H), 4.20–3.60 (m, 20H), 2.70 (bs, 4H), 2.00–1.90 (m, 4H), 1.75–1.63 (m, 2H), 0.88 (s, 18H), 0.03 (s, 12H).

1,1'-[[[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis[2-amino-N-allyloxycarbonyl-5-methoxy-1,4-phenylen)carbonyl]]bis[(2S)-2-hydroxymethyl-4-methyliden-2,3-dihydropyrrol] (216)

**[0058]** Eine Lösung von TBAF (3,02 ml einer 1 M Lösung in THF, 3,02 mmol) wurde zum Bissilylether (215) (1,23 g, 1,21 mmol) in THF (30 ml) bei 0 °C (Eis/Aceton) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und über Nacht gerührt. Am darauffolgenden Tag ergab ein DC (50:50 EtOAc/Pet-Ether (40–60 °C)), dass das Ausgangsmaterial vollständig verschwunden war. Es wurde gesättigtes NH<sub>4</sub>Cl (150 ml) zugesetzt und das Reaktionsgemisch mit EtOAc (3 × 60 ml) extrahiert, mit gesättigtem Natriumchlorid (150 ml) gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>), filtriert und im Vakuum eingedampft, um ein gelbes Öl zu ergeben. Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie (97 % CHCl<sub>3</sub> % MeOH) ergab den reinen Alkohol (216) (916 mg, 96 %):

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.61 (bs, 2H), 7.58 (s, 2H), 6.79 (s, 2H), 6.05–5.90 (m, 2H), 5.40–5.20 (m, 4H), 5.01 (bs, 2H), 4.93 (bs, 2H), 4.65–4.60 (m, 4H), 4.20–3.60 (m, 20H), 2.76 (dd, 2H, J = 8.42, 15.74 Hz), 2.47 (d, 2H, J = 15.93 Hz), 2.00–1.90 (m, 4H), 1.80–1.63 (m, 2H).

1,1'-[[[(Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis(11S,11aS)-10-(allyloxycarbonyl)-11-hydroxy-7-methoxy-2-methyliden-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4-benzodiazepin-5-on] (217)

**[0059]** Eine Lösung von Dimethylsulfoxid (0,57 ml, 0,63 g, 8,07 mmol) in trockenem Dichlormethan (17 ml) wurde 40 Minuten lang zu einer gerührten Lösung von Oxalylchlorid (2,02 ml einer 2 M Lösung, 4,04 mmol) bei –45 °C unter Stickstoffatmosphäre zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 40 Minuten lang bei –45 °C rühren

gelassen, gefolgt von der Zugabe des Diols 216 (0,89 g, 1,12 mmol) in Dichlormethan (17 ml) über einen Zeitraum von 15 Minuten bei derselben Temperatur. Nach weiteren 60 Minuten wurde eine Lösung von Triethylamin (1,31 ml, 9,42 mmol) in Dichlormethan (9 ml) 40 Minuten lang zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei  $-45^{\circ}\text{C}$  40 Minuten lang rühren gelassen, bevor es 45 Minuten lang auf Raumtemperatur erwärmen gelassen wurde. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser verdünnt, und die Phasen wurden sich trennen gelassen. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl ( $2 \times 40$  ml) sowie gesättigtem Natriumchlorid (40 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Entfernung des überschüssigen Lösungsmittels ergab das Rohprodukt, das mittels Flash-Säulenchromatographie (1 % Methanol, 99 % Chloroform) gereinigt wurde, um das Produkt 217 (0,175 g, 20 %) zu ergeben:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.22 (s, 2H), 6.65 (s, 2H), 5.82–5.70 (m, 2H), 5.58 (d, 2H,  $J = 9.70$  Hz), 5.25–5.00 (m, 8H), 5.75–4.35 (m, 4H), 4.30 (d, 2H,  $J = 16.10$  Hz), 4.15 (d, 2H,  $J = 17.03$  Hz), 4.01 (t, 4H,  $J = 6.32$  Hz), 3.90 (s, 6H), 3.64 (t, 2H,  $J = 8.70$  Hz), 3.00–2.85 (m, 2H), 2.71 (d, 2H,  $J = 16.29$  Hz), 2.00–1.85 (m, 4H), 1.70–1.60 (m, 2H).

1,1'-[[[Pentan-1,5-diyl)dioxy]bis(11aS)-7-methoxy-2-methyliden-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (218)

**[0060]** Eine katalytische Menge Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (13 mg, 11,2 mmol) wurde zu einer gerührten Lösung des Bisalloccarbinolamins (217) (170 mg, 0,22 mmol), von Triphenylphosphin (5,7 mg, 21,6 mmol) und Pyrrolidin (31 mg, 37,3 ml, 0,45 mmol) in DCM (13 ml) bei  $0^{\circ}\text{C}$  (Eis/Aceton) unter Stickstoffatmosphäre zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und der Reaktionsablauf mittels DC (95 %  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) verfolgt. Nach 2 Stunden ergab ein DC, dass die Reaktion beendet war, wodurch ein unter UV-Licht hell fluoreszierender Punkt auftrat. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck abgedampft und der resultierende Rückstand Flashchromatographie (99 %:98 %  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) unterzogen, was das Bisimin-Zielmolekül 218 als blassgelbes Glas (84,5 mg, 75 %) ergab, das wiederholt unter Vakuum mit  $\text{CHCl}_3$  eingedampft wurde, um die Iminform bereitzustellen:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.68 (d, 2H,  $J = 4.39$  Hz), 7.49 (s, 2H), 6.80 (s, 2H), 5.19 (bs, 2H), 5.16 (bs, 2H), 4.28 (bs, 4H), 4.15–4.00 (m, 4H), 3.92 (s, 6H), 3.90–3.80 (m, 2H), 3.12 (dd, 2H,  $J = 8.97, 15.93$  Hz), 2.95 (d, 2H,  $J = 15.93$  Hz), 2.00–1.85 (m, 4H), 1.72–1.67 (m, 2H).

#### Zytotoxizitätsdaten

**[0061]** Zur Veranschaulichung sind nachstehend die Zytotoxizitätsdaten für 80 (UP2001) angeführt.

#### In-vitro-Zytotoxizitätsstudien von NCI

**[0062]** Das National Cancer Institute (NCI) in Bethesda, Maryland, USA verfügt über ein Invitro-Zytotoxizitäts-Screeningverfahren, das aus ungefähr 60 menschlichen Tumorzelllinien besteht, gegen welche die Verbindungen in mindestens 5 Konzentrationen getestet werden, die sich jeweils um den Faktor 10 unterscheiden. Dabei wird eine 48-Stunden-Daueraussetzungsvorschrift angewandt, wonach die Lebensfähigkeit oder das Wachstum der Zellen mit einem SRB-Proteinassay abgeschätzt wird.

#### Verfahren

**[0063]** Die Testverbindungen wurden gegen etwa 60 menschliche Tumorzelllinien getestet. Die NCI-Screeningverfahren wurden detailliert von Monks und Mitarbeitern (Monks, A. et al., Journal of the National Cancer Institute 83, 757 (1991)) beschrieben. Kurz gefasst wurden Zellsuspensionen gemäß dem jeweiligen Zelltyp und der erwarteten Zielzellichte verdünnt (5.000–40.000 Zellen pro Well, bezogen auf die Zellwachstumseigenschaften) und mit Pipetten (100  $\mu\text{l}$ ) zu 96-Well-Mikrotiterplatten zugesetzt. Die Zellen wurden 24 Stunden lang zur Stabilisierung bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorinkubiert. Verdünnungen mit der doppelten beabsichtigten Testkonzentration wurden zum Zeitpunkt Null in 100- $\mu\text{l}$ -Aliquoten zu den Wells zugesetzt. Die Testverbindungen wurden in fünf 10fach-Verdünnungen ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$   $\mu\text{M}$ ) bewertet. Die Testverbindungen wurden 48 Stunden lang in 5%iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre mit 100 % Feuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Sulforhodamin-B-Test getestet. Ein Plattenleser wurde verwendet, um die optische Dichte abzulesen, und ein Mikrocomputer rechnete die Ablesungen in  $\text{LC}_{50}$ -Werte um, was die erforderliche Dosis zur Abtötung der Hälfte der Zellen darstellt.

**[0064]** Die in den Beispielen 5 bis 8 angeführten Ergebnisse sind  $\text{LC}_{50}$ -Werte, die unter 10  $\mu\text{M}$  liegen, was als Trennlinie zwischen Zytotoxizität und Nicht-Zytotoxizität herangezogen wird.

**[0065]** Die biologische Testabteilung des Developmental-Therapeutics-Programms des NCI hat ein In-vivo-Screeninggerät zum Vortesten auf potenzielle Antikarzinomaktivität von Verbindungen entwickelt, die durch das großmaßstäbliche In-vitro-Screeningverfahren identifiziert wurden. Für diese Tests werden menschliche Tumorzellen in Polyvinyliden- (PVDF-) Hohlfasern gezüchtet, und eine Probe jeder der Zelllinien wird in eine von zwei physiologischen Kompartimenten (intraperitoneal und subkutan) in Mäuse implantiert. Jede der Testmäuse erhielt insgesamt 6 Fasern (3 intraperitoneal und 3 subkutan), die jeweils 3 bestimmte Karzinomzelllinien darstellten. Diese Mäuse werden mit potenziellen Antikarzinomverbindungen in jeweils 2 Testdosen über den intraperitonealen Weg unter Verwendung eines QD × 4 Behandlungsplans behandelt. Trägerkontrollen bestehen aus 6 Mäusen, die nur den Verbindungsverdünnern erhalten. Die Faserkulturen werden am Tag nach dem letzten Behandlungstag gesammelt. Zur Untersuchung der Antikarzinomeigenschaften wird die lebensfähige Zellmasse für jede der Zelllinien unter Verwendung eines Formazinfarbstoff- (MTT) Umwandlungstests bestimmt. Daraus kann der prozentuelle T/C unter Verwendung der mittleren optischen Dichte von Proben, die mit der Verbindung behandelt wurden, dividiert durch die mittlere optische Dichte der Trägerkontrollen ermittelt werden. Zusätzlich dazu kann die Nettozunahme der Zellmasse für jede der Proben bestimmt werden, da eine Probe der Faserkulturen am Tag der Implantation in Mäuse auf lebensfähige Zellmasse getestet wird. Somit können die zytostatischen und zytotoxischen Fähigkeiten der Testverbindung überprüft werden.

**[0066]** Im Allgemeinen wird jede der Verbindungen gegen mindestens 12 menschliche Zelllinien getestet. Dies ergibt insgesamt 4 Versuche, da jedes der Experimente 3 Zelllinien enthält. Die Daten werden für jede der 2 Verbindungsdosen als prozentueller T/C gegen jede der Zelllinien angeführt, wobei für die intraperitonealen und subkutanen Proben getrennte Werte ermittelt werden.

**[0067]** Die Verbindungen werden für weitere In-vivo-Tests in subkutanen Standard-Xenograftmodellen, bezogen auf mehrere Hohlfasertestkriterien ausgewählt. Die Kriterien umfassen: (1) prozentueller T/C von 50 oder weniger in 10 von 48 möglichen Testkombinationen (12 Zelllinien × 2 Stellen × 2 Verbindungsdosen); (2) Fernaktivität (intraperitoneal verabreichtes Arzneimittel/subkutan verabreichte Kultur) in zumindest 4 von 24 möglichen Kombinationen; und/oder (3) eine Nettozellabtötung von 1 oder mehr der Zelllinien in jeder der Implantationsstellen. Zur Vereinfachung der Bewertung wurde ein Punktesystem entwickelt, das eine rasche Bewertung der Aktivität einer bestimmten Verbindung ermöglicht. Dazu wird jeder der Verbindungsdosen ein Wert von 2 zugeteilt, was zu einer 50%igen oder stärkeren Reduktion der lebensfähigen Zellmasse führt. Die intraperitoneal und subkutan verabreichten Proben werden getrennt bewertet, sodass die Kriterien (1) und (2) ausgewertet werden können. Verbindungen mit einem kombinierten IP- und SC-Punktwert von 20, einem SC-Punktwert von 8 oder einer Nettozellabtötung von einer oder mehreren Zelllinien werden Xenograft-Tests zugewiesen. Dieser Vergleich zeigte, dass es eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit gibt, dass eine aktive Verbindung übersehen wird, wenn der Hohlfasertest als Anfangs-In-vivo-Screeningverfahren verwendet wurde. Zusätzlich zu diesen Kriterien können andere Faktoren (z.B. einzigartige Struktur, Wirkmechanismus) zur Zuordnung einer Verbindung zum Xenograft-Testen führen, ohne dass die Verbindung diesen Kriterien entspricht.

#### Menschliche Xenograft-Studien des NCI

**[0068]** Diese werden an athymischen Nacktmäusen mit beeinträchtigtem Immunsystem durchgeführt. Das zu testende menschliche Tumorgewebe wird in ihre Körperflanken implantiert, und während die Kontrollmäuse keine Behandlung erhalten, werden die anderen unterschiedlichen, intraperitoneal verabreichten Dosen der Testverbindung ausgesetzt. Die Ergebnisse sind als Toxizität der Verbindung, als Ausmaß an Tumorstadium und als Hemmung des Wachstums ausgedrückt.

#### Beispiel 3(a): In-vitro-Zytotoxizität

**[0069]** Verbindung 80 wurde der In-vitro-Zytotoxizitätsstudie des NCI unterzogen. Die Ergebnisse (LC<sub>50</sub>; µM) sind nachstehend angeführt.



TUMOR-TYP	ZELLINIEN-BEZEICHNUNG	UP2001 (80)
		LC <sub>50</sub> (µM)
Lunge	NI-H460	2,7
Kolon	HCC-2998	0,099
ZNS	SNB-75	7,5
Melanome	MALME-3M	0,073
	UACC-62	0,077

**[0070]** Das PBD-Dimer UP2001 (80) zeigte wirksame und selektive Zytotoxizitätsaktivität gegenüber der Lungenkarzinomzelllinie NCI-N460, der Kolonzelllinie HCC-2998, der ZNS-Karzinomzelllinie SNB-75 und der Melanomzelllinien MALME-3M (sehr wirksam, 0,08 µM) und UACC-62 (sehr wirksam 0,07 µM), was auf seine Fähigkeit, DNA zu vernetzen, zurückführbar ist.

#### Beispiel 3(b): Hohlfasertest

**[0071]** Verbindung 80 wurde dem NCI-Hohlfasertest unterzogen; die Ergebnisse sind nachstehend angeführt.

	UP2001 (80)
IP-Punktwert	40
SC-Punktwert	14
Gesamtpunktwert	54
Zellabtötung	Ja

**[0072]** UP2001 ist aufgrund seines kombinierten IP- und SC-Punktwerts (54), der weit über 20 lag, wobei sein SC-Punktwert mehr als 8 betrug, ausgewählt worden.

#### Beispiel 3(c): Menschliche Xenograft-Studien

**[0073]** Menschliche Xenograft-Studien wurden auf dem UP2001 von der oben beschriebenen biologischen Testabteilung des NCI durchgeführt.

**[0074]** Athymische Nacktmäuse mit den MD-MB-435-Xenografts (menschlicher Brusttumor), Ovar-3 (menschlicher Ovarialtumor), UACC-62 (menschliches Melanom) oder OV-CAR-5 (menschlicher Ovarialtumor) wurden mit Dosen von 0,67 (hoch), 0,45 (mittel) und 0,3 (niedrig) mg/kg/Injektion einmal alle 4 Tage insgesamt 3 mal (6 Mäuse pro Dosis bei 20 Kontrollmäusen) behandelt.

**[0075]** UP2001 (80) wurde durch Messung der Toxizität des Arzneimittels und dessen Fähigkeit zur Verlangsamung des Tumorwachstums bewertet.

Tumor	Toxizität			% T/C			% Wachstumsverzögerung		
	hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig
MDA-MB-435	3/6	1/6	2/6	toxisch	3	3	41	41	41
OVCAR-3	0/6	0/6	0/6	7	20	46	73	73	9
UACC-62	0/6	0/6	0/6	22	28	67	43	43	43
OVCAR-5	0/6	0/6	0/6	52	45	38	16	28	32

**[0076]** Die Toxizität ist durch die Anzahl an Mäusen, die aufgrund der Behandlung starben, angegeben. % T/C stellt die Tiefe der Tumoren in den "Test"-Mäusen (T) (mit Greifzirkeln gemessen), verglichen mit den unbehandelten Kontrollmäusen (C), dar und ist in Prozent angegeben. % Wachstumsverzögerung stellt die Verlängerung der verstrichenen Zeit dar, die erforderlich ist, damit Tumoren eine willkürliche Größe von 250 mg erreichen.

**[0077]** In den MDA-435-Xenograften schränkte UP2001 das Tumorwachstum in den behandelten Mäusen auf nur 3 % des in der Kontrollpopulation beobachteten Tumorwachstums ein. Zusätzlich dazu wurde eine 41%ige Verlangsamung der Zeit beobachtet, in der die Tumormasse 250 mg erreicht. Sogar bei geringer Dosis wurde eine gewisse Toxizität gegenüber den Wirten beobachtet.

**[0078]** Eine gute Dosisantwort wurde für UP2001 (80) in den Ovar-3-Xenograften festgestellt. Bei der hohen Dosis betrug das Tumorstadium in den behandelten Mäusen, verglichen mit jenem der Kontrollpopulation, lediglich 7 %. Bei der mittleren Dosis betrug der Wert 20 %, und bei der niedrigen Dosis wiesen die Tumoren der behandelten Mäuse 46 % der Größe der Kontrolltumoren auf. Bei der hohen Dosis wurde eine 73%ige Wachstumsverzögerung bis zur Erreichung einer Tumormasse von 250 mg beobachtet. Keine der Mäuse starb durch die Aussetzung gegenüber UP2001 (80).

**[0079]** Eine ähnliche Dosisantwort gegenüber Tumorstadium wurde in den UACC-62-Xenografts für UP2001 (80) beobachtet. Bei der hohen Dosis wiesen die behandelten Tumoren 22 % der Größe der Kontrolltumoren auf. Bei der mittleren Dosis betrug die Größe der behandelten Tumoren 28 % jener der Kontrolltumoren, und bei der niedrigen Dosis wiesen die behandelten Tumoren 67 % der Größe der Kontrolltumoren auf. Erneut starb keine der Mäuse durch Aussetzung gegenüber UP2001 (80).

**[0080]** Ergebnisse für den menschlichen Ovarialtumor OVCAR-5 waren weniger eindeutig; eine etwa 50%ige Tumorstadiumsreduktion wurde beobachtet sowie eine gewisse Wachstumsverzögerung, wobei die Aktivität bei geringeren Konzentrationen stärker zu sein schien. Dabei wurden jedoch durch die Aussetzung gegenüber UP2001 (80) Mäuse getötet.

**[0081]** UP2001 (80) wurde auch gegenüber dem menschlichen ZNS-Tumor SF-295 getestet. Athymische Nacktmäuse mit SF-295 wurden mit Dosen von 0,40, 0,27 und 0,18 mg/kg pro intravenös verabreichter Injektion einmal täglich insgesamt 5 mal behandelt.

Toxizität			% T/C			tumorfrei		
hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig
2/6	1/6	2/6	0 %	0 %	0 %	4/4	5/5	3/4

**[0082]** UP2001 (80) zeigte heilende Eigenschaften gegen SF-295-Xenografts. Bei der hohen und der mittleren Dosis waren alle überlebenden Mäuse am Tag 27 des Versuchs tumorfrei. Bei der niedrigen Dosis waren 3 von 4 Mäusen am Tag 27 tumorfrei. Eine gewisse Toxizität wurde mit der Behandlung in Zusammenhang gebracht, da 2 Mäuse bei der hohen Dosis, 1 bei der mittleren Dosis und zwei bei der niedrigen Dosis starben. Die höheren Intensitäten des Injektionsplans können sich durch die festgestellte höhere Sterblichkeitsrate widerspiegeln.

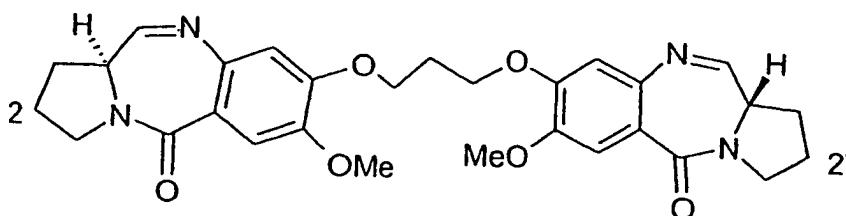
#### Beispiel 4: weitere Ergebnisse für das PBD-Dimer SJG-136 (UP2001 80)

**[0083]** Die Verbindung 80 wurde weiteren Tests unterzogen.

**[0084]** Der erste Test, der von G.B. Jones et al. in Anti-Cancer Drug Des. 5, 249 (1990) beschrieben und hierin durch Verweis aufgenommen ist, bestimmt die Auswirkung der Testverbindung auf die DNA-Helixschmelztemperatur. Dieser Test dient dazu, Aufschlüsse über die Festigkeit und das Ausmaß der Vernetzung von DNA-Strängen durch die Testverbindung zu geben (nämlich als Maß für die Stabilisierung der DNA nach erfolgter Ligandenbindung).

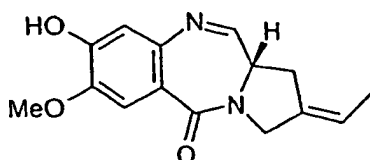
**[0085]** Die Schmelztemperatur wurde für ein 1:5-Molverhältnis von [Ligand]:[DNA] bestimmt, wobei die Kalbsthymus-DNA-Konzentration 100 mM in wässrigem Natriumphosphatpuffer (10 mM Natriumphosphat + 1 mM EDTA, pH 7,00 ± 0,01) beträgt. Für die Kalbsthymus-Konzentration bei einem pH von 7,00 ± 0,01 beträgt die Schmelztemperatur 67,83 ± 0,06 °C (Mittelwert von 30 Einzelbestimmungen).

**[0086]** Bei einem 1:5-Molverhältnis von [PBD]:[DNA] erhöht das PBD-Dimer 80 die Helixschmelztemperatur ( $\Delta T_m$ ) der Kalbsthymus-DNA um beispiellose 33,6 °C nach 18-stündiger Inkubation bei 37 °C. Unter identischen Bedingungen stellt das Dimer DSB-120 mit unsubstituiertem C-Ring:



DSB-120

ein  $\Delta T_m$  von 15,1 °C bereit, was die außergewöhnliche Wirkung der Einführung einer C2/C2'-Unsättigung zeigt. Übereinstimmend mit anderen PBD-Dimeren zeigt 80 seine stärkste Wirkung in den GC-reichen oder Hochtemperaturbereichen der DNA-Schmelzkurven. Auf ähnliche Weise wie DSB-120 stellt 80 etwa 60–80 % seiner Stabilisierungswirkung ohne vorherige Inkubation bereit, was auf eine kinetische Wirkung im PBD-Reaktivitätsprofil schließen lässt. Die vergleichenden  $\Delta T_m$ -Kurven zeigen jedoch, dass ausschließlich auf Basis der Konzentration SJG-136  $\geq 10$ -mal wirksamer als DSB-120 ist. Sogar bei einem [PBD]:[DNA]-Molverhältnis von 1:100 weist SJG-136 nach wie vor eine signifikant bessere DNA-Bindungsaffinität auf als das Monomer Tomamycin bei einem 1:5-Molverhältnis von [PBD]:[DNA].



Tomamycin

**[0087]** Die Ergebnisse für das [PBD]:[DNA]-Verhältnis von 1:5 sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst (sämtliche  $\Delta T_m$ -Werte  $\pm 0,1$ – $0,2$ °C).

Verbindung	Induziertes $\Delta T_m$ (°C) nach Inkubation bei 37 °C nach		
	0 h	4 h	18 h
SJG-136 (80)	25,7	31,9	33,6
DSB-120	10,2	13,1	15,1
Tomamycin	0,97	2,38	2,56

**[0088]** Die in obiger Tabelle angeführten Daten zeigen, dass SJB-136 (80) gemäß diesem speziellen Test das bis dato wirksamste DNA-Stabilisierungsmittel ist.

**[0089]** Mit dem zweiten Test wurde die Zytotoxizität von SJG-136 (80) in der menschlichen Ovarialzelllinie A2780 und deren Cisplatin-resistenten Sublinie A2780cisR bestimmt und diese Daten mit der Zytotoxizität des verwandten Dimers DSB-120 (siehe oben) und von Cisplatin verglichen. Bezogen auf die Ausgangslinie ist von der A2780cisR-Linie bekannt, dass sie über erhöhte GSH-Werte, einen erhöhten Reparaturwert von DNA-Cisplatinaddukten und eine geminderte Fähigkeit zur Aufnahme von Cisplatin verfügt (M. Smellie et al. Br. J. Cancer 70, 48 (1994)).

**[0090]** Die durch 96-stündiges Inkubieren der Zellen mit den Verbindungen bei 37 °C erzielten Ergebnisse sowie die Bestimmung der Zellanzahl unter Verwendung von Sulforhodamin B sind in nachstehender Tabelle angeführt.

	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM) für		
	A2780	A2780cis <sup>R</sup>	RF <sup>b</sup>
SJG-136 (80)	0,000023	0,000024	1,1
DSB-120	0,0072	0,21	29,2
Cisplatin	0,265	8,4	32

<sup>a</sup> Dosis der Verbindungen, die erforderlich ist, um das Zellwachstum im Vergleich zu Kontrolle, um 50% zu he-

men.

<sup>b</sup> RF ist der Resistenzfaktor ( $LC_{50}$ -resistent/Ausgangslinie)

**[0091]** Der  $LC_{50}$ -Wert für 80 in der A2780-Zelllinie beträgt nur 23 pM, was, verglichen mit DSB-120 ( $LC_{50}$  = 7,2 nM), einem 320fachen Anstieg der Zytotoxizität entspricht. Interessanter ist jedoch, dass während DSB-120 eine reduzierte Wirksamkeit in der Cisplatin-resistenten A2780cisR ( $LC_{50}$  = 0,21 mM) aufweist, ist SJG-136 mit einem ähnlichen  $LC_{50}$ -Wert (24 pM), verglichen mit der normalen A2780, fast 9.000-mal wirksamer bei dieser Zelllinie, was einen Resistenzfaktor von 1,1 ergibt. Die Tatsache, dass sowohl DSB-120 als auch Cisplatin für dieses Paar von Zelllinien einen Resistenzfaktor von 2,92 bzw. 32 ergeben, stellt einen Hinweis darauf dar, dass SJG-136 potenziell zur Behandlung von Cisplatin-resistenten Erkrankungen dienen kann.

#### Beispiel 5: Ovarialkarzinom-Zytotoxizitätstest

**[0092]** Die Verbindung 80 (und Anthramycin als Vergleich) wurde von Dr. Lloyd R. Kellands Gruppe am Institute of Cancer Research, Sutton, GB, auf ihre zytotoxische Aktivität in Ovarialzelllinien überprüft. Die untersuchten fünf Zelllinien waren SKOV-3, A2780/A2780cisR und CH1/CH1cisR (cisR kennzeichnet eine Cisplatin-resistente Zelllinie).

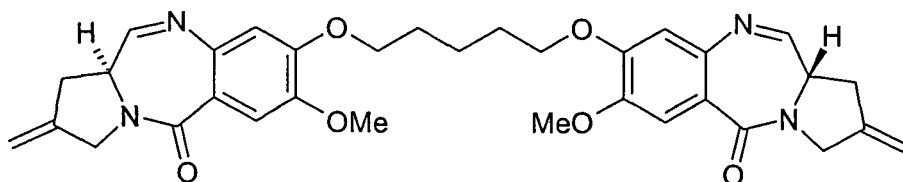
**[0093]** Einzelne lebensfähige Zellen wurden in ein Wachstumsmedium (160 µl) in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert und über Nacht binden gelassen. Die PBDs wurden anschließend unmittelbar vor der Zugabe zu den Zellen in Wells in vierfacher Ausführung in DMSO gelöst (was Arzneimittelkonzentrationen von 20 mM ergab). Die Arzneimittellendkonzentrationen in den Wells lagen wie folgt im Bereich von 100 µM bis 2,5 nM: 100, 25, 10, 2,5, 1 µM, 250, 100, 25, 10, 2,5 nM (die Arzneimittel wurden im Wachstumsmedium verdünnt und anschließend 40 µl zum bestehenden Wellvolumen von 160 µl zugesetzt, was die obigen Endkonzentrationen ergab). Nach 96 Stunden wurde das Medium entfernt und die restlichen Zellen durch 30-minütiges Aussetzen gegenüber 10%iger Trichloressigsäure auf Eis fixiert. Die Wells wurden sodann 3 bis 4 mal mit Leitungswasser gewaschen, über Nacht luftgetrocknet und mit 100 µl in 1%iger Essigsäure gelöstem Sulforhodamin B (0,4 %) versetzt. Färbung wurde weitere 10 bis 15 Minuten ermöglicht, anschließend die Wells 3 bis 4 mal mit 1%iger Essigsäure gewaschen, luftgetrocknet und anschließend zu Tris-Base (100 µl von 10 mM) zugesetzt. Die Platten wurden geschüttelt und Extinktionsablesungen bei 540 nm mittels Plattenleser vorgenommen. Unter Verwendung des Quattro-Pro-Softwarepakets wurden die  $LC_{50}$ -Werte aus Diagrammen der Konzentration über der prozentuellen Extinktion (verglichen mit 8 unbehandelten Wells) ermittelt.

UP Nr.	$LC_{50}/\mu M$				
	A2780	A2780cis	CH1	CH1cisR	Skov3
Anthramycin	0,155	0,16	0,062	0,05	0,16
UP2001 (80)	0,000023	0,000024	0,00012	0,0006	0,0091

**[0094]** UP2001 (80) zeigt in pikomolaren/subnanomolaren Mengen über die gesamte Gruppe der Ovarialzelllinien Zytotoxizität. Die Wirksamkeit des Moleküls hängt wahrscheinlich mit seinen Vernetzungseigenschaften – in Verbindung mit der Wirkung der Exo-Sättigung – zusammen.

#### Patentansprüche

1. Verbindung der Formel:



2. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach Anspruch 1 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünner umfasst.

3. Verbindung nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlungsmethode durch Therapie.

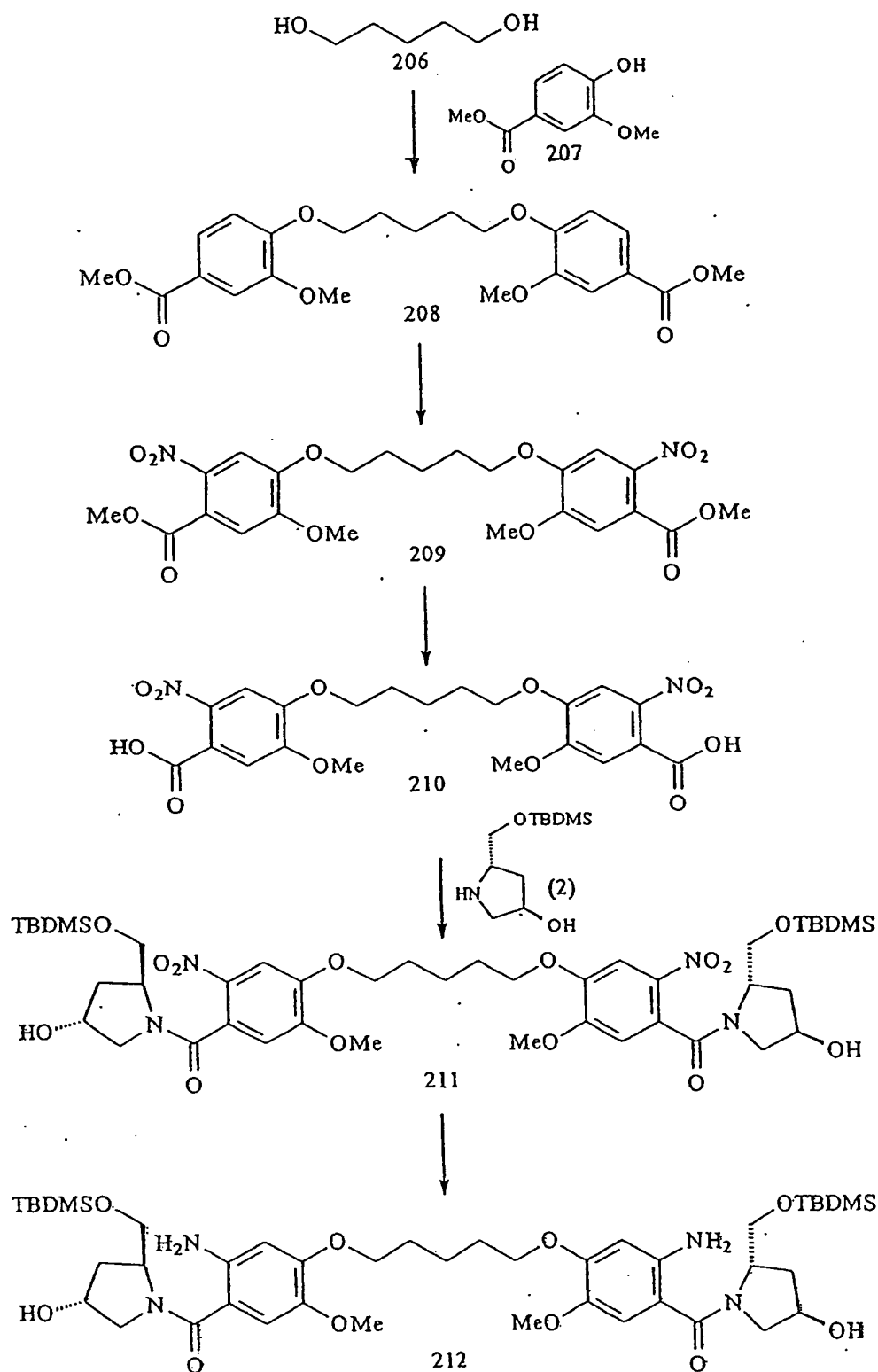
4. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer proliferativen Erkrankung.

5. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer viralen, parasitären oder bakteriellen Infektion.

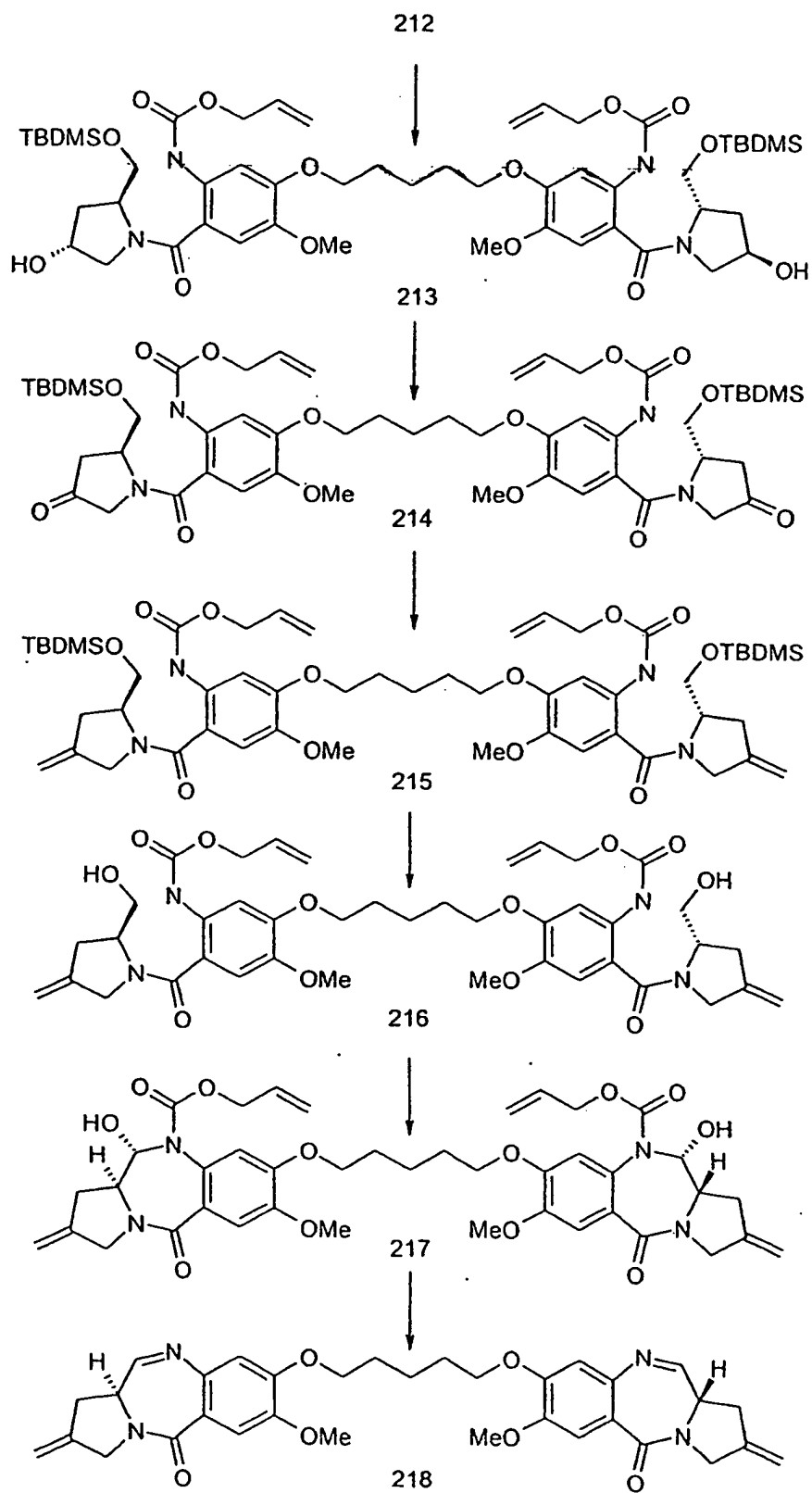
6. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Figur 1a



Figur 1b